

プロピオン・オルセイン染色法によるサツマイモ ネコブセンチュウの染色体調査

平 田 賢 司

横浜植物防疫所調査研究部

Chromosomal observation for the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, using the propionic-orcein method. Kenji HIRATA (Yokohama Plant Protection Station, 1-16-10, Shinyamashita Naka-ku, Yokohama 231-0801 Japan). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* **34**: 67-69 (1998).

Abstract: Chromosomal observation of oogenesis using the propionic-orcein method was studied in three isolates of *Meloidogyne incognita* from Ibaraki, Japan. Oogonial divisions occurred in the germinal zone of the ovary, but the somatic chromosome number could not be determined precisely. Prophase chromosomes of an oocyte located in the anterior half of the uterus consisted of two discrete chromatids (univalents chromosomes). The chromosome number was determined to be 44 chromosomes during the prophase and metaphase figures of the first maturation division.

Key words: chromosome, propionic-orcein method, *Meloidogyne incognita*

は じ め に

植物寄生線虫の染色体調査は、ネコブセンチュウやシストセンチュウなどをはじめ数多くの種類で、染色体数と染色体観察に基づいてその生殖方法が調査され (TRIANTAPHYLLOU, 1971, 1979), 種の識別や種・属間などの系統関係を把握するために利用されている (TRIANTAPHYLLOU, 1979, 1985; TRIANTAPHYLLOU and HIRSCHMANN, 1980)。染色体数の相違が種の識別に用いられている例としては、ミカンネモグリセンチュウ (*Radopholus similis*) がバナナネモグリセンチュウ (*R. similis*, $n=4$) とカンキツネモグリセンチュウ (*R. citrophilus*, $n=5$) の 2 種に分けられた際の識別点のひとつとして報告されている (HUETTEL *et al.*, 1984)。また、ネコブセンチュウでは、染色体数と生殖方法の違いによって区別されるレースが報告されている (TRIANTAPHYLLOU, 1985)。

そこで、植物検疫において、植物寄生線虫の染色体調査を行う上で、その調査法のひとつであるプロピオン・オルセイン染色法が実用的な方法であるかどうかを検討するために、卵形成過程にあるサツマイモネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita*) の生殖細胞について、染色体とその数の調査を行った。

材料及び方法

1. 供試線虫

供試した線虫は、茨城県産のトマトの根から採取し、雌成虫の会陰紋及び第 2 期幼虫の形態により同定したサツマイモネコブセンチュウを単一卵嚢毎にトマトで増殖した。増殖した株 (系統)の中から 3 系統を選び、トマトで線虫の増殖を行った。トマトの根から、実体顕微鏡下で産卵している若い雌成虫を摘出して、0.9% 塩化カリウム溶液に入れた。

2. プロピオン・オルセイン染色法

プロピオン・オルセイン染色法による染色体の観察は、TRIANTAPHYLLOU (1985)の方法を参考として、以下のとおりに行った。スライドガラス上に供試した雌成虫を少量の 0.9% 塩化カリウム溶液とともに数頭移し、メスで雌成虫の頸部を切断して、生殖器官を遊出させた。遊出した生殖器官は、そのまわりの水分を乾燥して、スライドガラス上に塗抹させた。1 規定塩酸に 10 分間浸漬、乾燥後直ちに、エチルアルコールと無水酢酸 3:1 液に 20 分間浸漬した。スライドガラス上の塗抹部にオルセイン染色液を滴下、20~30 分間静置して染色後、45% プロピオン酸に浸したカバーガラスで覆い、ZUT 液でシールした。染色体の観察は生物顕微

鏡 (2,300 倍) で行った。

結果及び考察

本線虫の卵形成過程の生殖器官は、卵巢先端部の原細胞域、成長域 (原細胞域以外の卵巢部分)、輸卵管、貯精囊及び子宮から成っていた。原細胞域では、細胞分裂により卵原細胞の増殖が認められ、卵原細胞内に

体細胞分裂の中期 (Fig. 1A) やその他の期間の染色体が観察された。しかし、原細胞域では、染色体が重なっているため、染色体数を決めることができるような染色体像は観察できなかった。原細胞域と成長域の間には、濃く染色された卵母細胞の太子期の染色体が観察された (Fig. 1B)。卵母細胞は、成長域で細胞の大きさが増し、輸卵管及び貯精囊を経て子宮に達した。成長域、輸卵管及び貯精囊では、染色体の分裂は明瞭に

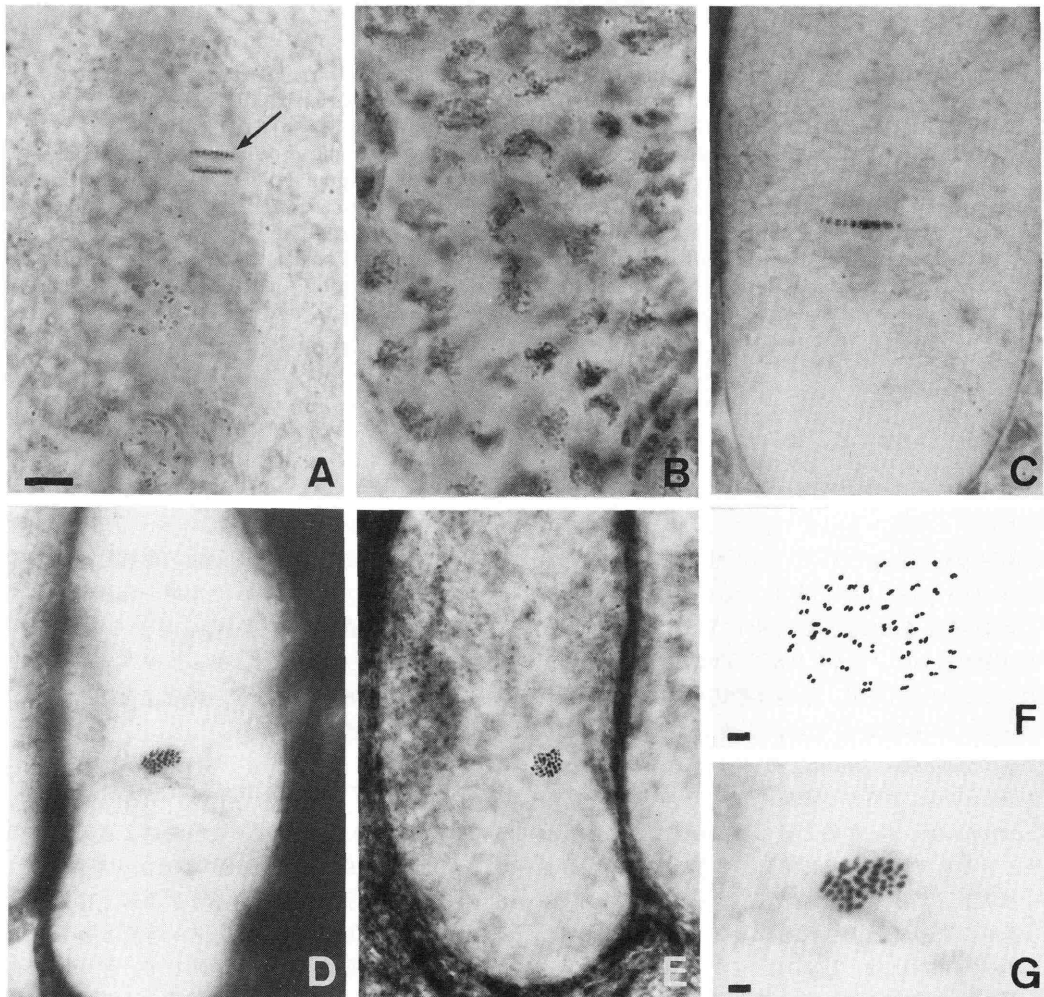


Fig. 1. Chromosomal figures during oogenesis of *M. incognita*.

A. Apical part of the ovary (germinal zone), oögonium at metaphase of mitotic division (side view; arrow). B. Synapsis zone of the ovary adjacent to the germinal zone. C. Metaphase figures (side view) of an oocyte located in the posterior half of the uterus. D, E and G. Metaphase to telophase figures (polar view) with 44 chromosomes in the posterior half of the uterus. F. Prophase figures with 44 univalent chromosomes in an oocyte located in the anterior half of the uterus (camera lucida drawing). Scales: A-E=10 μ m, F=1.0 μ m, G=2.0 μ m.

観察できなかった。子宮の貯精嚢に近い部分にある卵母細胞では、2本の染色分体から成る44対の一価染色体が観察され、分裂前期に相当した (Fig. 1F)。また、子宮内の卵母細胞では、44本からなる分裂中期から後期の染色体が観察され (Fig. 1D, E and G)、分裂中期の分裂面に対して横方向からの分裂像も観察された (Fig. 1C)。供試した本線虫の3系統では、染色体の分裂像及び染色体数ともに同じように観察された。

卵の形成は、原細胞域の体細胞分裂で細胞の増殖が行われ、成長域を経て、子宮内の卵母細胞では、第1期成熟分裂の各期間が観察された。第1期成熟分裂の前期に44対の一価染色体が観察されたことから、今回供試した本線虫の生殖方法は、体細胞分裂型の単為生殖であり、その染色体数は44であった。また、サツマイモネコブセンチュウの染色体には、倍数性のあることが報告されている (TRIANTAPHYLLOU, 1981) ことから、今回観察した染色体は3倍体 (3n) に相当した。

今回の観察結果は、これまでに報告されたサツマイモネコブセンチュウの染色体及び生殖方法の結果と一致した (TRIANTAPHYLLOU, 1981)。

以上の結果から、今回用いた本線虫では、染色体各時期の分裂が観察され、その染色体数を決定した。しかしながら、プロピオン・オルセイン染色法では、数多くの染色した試料の中から分裂期にある染色体像を探し出して、染色体を数えることが必要となる。このため、植物検疫で用いるためには、分裂中期像が得られやすいコルセミド処理を用いた調査とともにプロピオン・オルセイン染色法よりも染色体に対する染色感度の高い蛍光染色法 (ROUPPE VAN DER VOORT *et al.*, 1996) を用いて、今後調査を行うことが必要と考える。

引用文献

- HUETTEL, R. N., D. W. DICKSON and D. T. KAPLAN (1984) *Radopholus citrophilus* sp. n. (Nematoda), a sibling species of *Radopholus similis*. Proc. Helm. Soc. Wash. **51**: 32-35.
- ROUPPE VAN DER VOORT, J. N. A. M., E. L. J. G. VAN ENCKEVORT, L. P. PIJNACKER, J. HELDER, F. J. GOMMERS and J. BAKKER (1996) Chromosome number of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. Fundam. appl. Nematol. **19**: 369-374.
- TRIANTAPHYLLOU, A. C. (1971) Genetics and cytology. In: Plant Parasitic Nematodes. Vol. 2 (ZUCKERMAN, B. M., *et al.*, eds.), Academic Press, New York, 1-34.
- TRIANTAPHYLLOU, A. C. (1979) Cytogenetics of root-knot nematodes. In: Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* species). Systematics, Biology and Control. (LAMBERTI, F. & TAYLOR, C. E., eds.). Academic Press, London, 85-109.
- TRIANTAPHYLLOU, A. C. (1981) Oogenesis and the chromosomes of the parthenogenetic root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. J. Nematol. **13**: 95-104.
- TRIANTAPHYLLOU, A. C. (1985) Cytogenetics, cytotaxonomy and phylogeny of root-knot nematodes. In: An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Vol. 1 (J. N. SASSER, J. N. & CARTER, C. C. eds.) North Carolina State University Graphics, Raleigh, 113-126.
- TRIANTAPHYLLOU, A. C. and H. HIRSCHMANN (1980) Cytogenetics and morphology in relation to evolution and speciation of plant-parasitic nematodes. Ann. Rev. Phytopathol. **18**: 333-359.